



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In the Patent Application of:)
ARRENA ET AL.) Examiner: A. JOHNS
)
Serial No. 09/929,833) Art Unit: 2621
)
Confirmation No. 8843) Attorney Docket No. 53535
)
Filing Date: AUGUST 14, 2001)
)
For: SYSTEM FOR AUTOMATIC ANALYSIS)
OF IMAGES SUCH AS DNA)
MICROARRAY IMAGES)
_____)

TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Mail Stop AF
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Transmitted herewith is a certified copy of the
priority European Application No. 00830588.0.

Respectfully submitted,

DOUGLAS J. VISNIUS
Reg. No. 48,012
Allen, Dyer, Doppelt, Milbrath
& Gilchrist, P.A.
255 S. Orange Avenue, Suite 1401
Post Office Box 3791
Orlando, Florida 32802
Telephone: 407/841-2330
Fax: 407/841-2343
Agent for Applicants

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being
deposited with the United States Postal Service as first class
mail in an envelope addressed to MS AF, Commissioner for
Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on this 1st
day of August, 2005.



THIS PAGE BLANK (USPTO)



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

00830588.0

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 24/08/01
LA HAYE, LE

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 00830588.0

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt: 25/08/00 ✓

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
STMicroelectronics S.r.l.
20041 Agrate Brianza (Milano)
ITALY

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

A system for the automatic analysis of images, such as DNA microarray images

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

G06F19/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

See for original title of the application
page 1 of the description.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sistema per l'analisi automatica di immagini, quali immagini di microarray di DNA

5 Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda il settore dell'analisi delle immagini ed è stata sviluppata con particolare attenzione alla possibile applicazione all'analisi del DNA, soprattutto in vista dell'analisi automatica delle immagini prodotte tramite un
10 cosiddetto microarray o chip di DNA (DNA chip).

L'analisi automatica del DNA si basa in via principale sull'esame dell'RNA messaggero che controlla il modo in cui differenti parti dei geni vengono
15 attivate o disattivate per creare certi tipi di celle.

Se il gene è espresso in un solo modo, esso può originare una normale cellula muscolare, mentre se è espresso in un altro modo può dare origine a un tumore.

Confrontando le diverse espressioni dei geni, i
20 ricercatori mirano a scoprire il modo per predire e prevenire le malattie tumorali.

Un'altra possibile applicazione è la cosiddetta farmacogenomica, disciplina con cui gli scienziati tentano di correlare le più piccole variazioni nel DNA
25 di una persona con le reazioni a varie sostanze quali i farmaci o le droghe.

Numerose altre possibili applicazioni sono in corso di impiego, di sviluppo e di studio.

Descrizione della tecnica nota

30 Nel corso degli ultimi anni, per consentire l'analisi automatica del DNA, è stata sviluppata la tecnica basata sull'impiego dei cosiddetti DNA chip.

Si tratta in sostanza di piccole superfici piane sulle quali vengono deposte - secondo una tipica
35 configurazione a matrice - alcune file, chiamate

sonde, di una delle due metà della doppia elica del DNA.

Poiché ogni metà della doppia elica si lega naturalmente con la metà sua complementare in un
5 processo che viene chiamato ibridazione, il DNA chip può essere usato per identificare la presenza di particolari geni in un campione biologico.

Questi chip, che - per la loro organizzazione matriciale, eventualmente di tipo lineare - vengono
10 denominati "microarray", possono essere fabbricati utilizzando tecnologie diverse, tra cui quella dei semiconduttori, su una varietà di superfici, tra cui vetro e plastica.

L'uso dei microarray di DNA per delineare
15 l'espressione dei geni è l'applicazione più importante dei "biochip". Tale metodologia ha soppiantato completamente i metodi precedenti, che avevano lo svantaggio di dover essere ripetuti gene per gene o per gruppi limitati di geni ed erano inoltre difficili da
20 automatizzare.

Per una generale illustrazione di una possibile applicazione di queste metodologie si può fare utilmente riferimento al lavoro di DeRisi J. Et al.,
25 "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer", NatGenet 1996 Dec;14(4),457-60.

Di solito i microarray di DNA vengono usati come chip di memoria tutti connessi tra loro, al fine di confrontare campioni di DNA di un paziente con campioni
30 conservati e noti di DNA.

Infatti, il DNA trasporta una carica elettrica e tale carica può essere letta su un chip, esattamente nello stesso modo in cui ciò avviene per una cella in una matrice di celle di memoria.

In molti DNA chip l'accoppiamento delle file di DNA viene segnalato mediante materiali fluorescenti. Tuttavia la procedura per analizzare il chip, in particolare per rilevare i livelli di fluorescenza, è piuttosto onerosa.

Per evitare questi inconvenienti, sono stati sviluppati svariati metodi.

Ad esempio, è nota una soluzione messa a punto dalla società Micro Sensors in collaborazione con la società Motorola in cui gli accoppiamenti delle file di DNA vengono rilevati con metodi bio-elettronici.

Questa soluzione prevede in sostanza di depositare su un circuito stampato su scheda da 10 a 50 sonde di DNA. Invece di usare la fluorescenza, viene usato un atomo organico che contiene il ferro e che può generare un segnale elettronico quando le file di DNA si accoppiano.

Negli ultimi anni sono state anche elaborate metodologie parallele che consentono la quantizzazione simultanea del livello di espressione di un numero molto elevato di geni attraverso l'interrogazione simultanea, con elevata sensibilità e fedeltà di riconoscimento, del profilo di espressione di un completo repertorio di geni.

Con un certo grado di schematizzazione, ma con sostanziale aderenza alla realtà, le metodologie basate sull'impiego dei microarray di geni si possono idealmente ricondurre ad alcune classi principali.

Rappresentativo di una prima classe di soluzioni è il metodo messo a punto dal Prof. Brown, che consente, attraverso microlavorazione robotizzata, di immobilizzare chimicamente in microgriglie di 2 cm. per 2 cm. frammenti di cDNA (complementary DNA), ovvero di DNA ricostruito a partire da RNA per trascrittasi inversa. In tal modo vengono ottenuti microarray

contenenti 10.000 singoli cDNA. Il frammento di DNA che si vuole analizzare viene marcato con gruppi fluorescenti, in modo da ottenere sonde di tipi differenti, così da distinguere immediatamente i
5 frammenti di DNA attraverso il colore del corrispondente gruppo fluorescente con il quale vengono trattati. In tal modo, tutto il microarray può essere analizzato in maniera simultanea mentre avviene la fase di ibridazione. La lettura della microgriglia tramite
10 microscopio confocale alla fine della fase di ibridazione fornisce un'immagine bidimensionale in cui appaiono punti o spot colorati organizzati in una griglia. L'intensità dei vari colori e delle loro combinazioni è direttamente correlata all'intensità
15 della luce emessa per fluorescenza dalle relative sonde ed al grado di affinità tra le sonde ed i singoli geni depositati sulla griglia stessa.

E' conosciuta anche una tecnica, denominata di micro-spotting, dove un braccio di un robot si immerge
20 in corrispondenza di un array di punti (pin) in un materiale di DNA e poi lo imprime su un supporto di vetro.

Ancora un'altra metodologia basata sull'impiego di dei microarray è stata introdotta dalla società
25 Affymetrix. Questa tecnica utilizza, per la costruzione della microgriglia, oligonucleotidi sintetici anziché frammenti naturali di DNA. Tali frammenti vengono depositati sulla griglia mediante la tecnica della fotolitografia. In particolare, per costruire sonde di
30 DNA a singola fila vengono usate maschere per esporre alcune parti di un wafer di vetro su cui avvengono certi processi chimici.

L'uso della fotolitografia, accoppiata alla sintesi chimica degli oligonucleotidi, permette di
35 avere su un singolo microarray la presenza di circa

100.000 geni che, secondo stime correnti, compongono il repertorio completo dei caratteri trascritti nell'uomo.

I metodi descritti forniscono come risultato finale un'immagine che esprime, attraverso la
5 gradazione di diversi colori o combinazioni di colori, il grado di espressione genica all'interno del frammento di DNA che si vuole analizzare.

Il principale vantaggio della metodologia dei microarray consiste nella possibilità di effettuare
10 l'analisi simultanea di un elevatissimo numero di geni.

E' infatti possibile elaborare in parallelo le informazioni legate alle diverse celle presenti sul DNA chip con la conseguente possibilità di aumentare il numero di celle del microarray fino a valori
15 dell'ordine di 10.000-100.000 celle.

In questo modo risulta possibile realizzare sistemi di analisi automatica di frammenti di DNA che utilizzano tecniche di elaborazione delle immagini provenienti da microarray dopo ibridazione.

20 Tuttavia, i sistemi di questo tipo sinora realizzati si basano sull'analisi di immagini molto grandi (numero di pixel di 1-2 ordini di grandezza più elevato rispetto al numero di celle che costituiscono la microgriglia). Queste immagini possono essere
25 acquisite in parallelo, ma vengono trasferite ed elaborate in modo sequenziale, come avviene solitamente nelle tecniche di analisi che usano microprocessori digitali, con una conseguente forte penalizzazione in termini di velocità di elaborazione.

30 Pertanto, l'idea di utilizzare un DNA-chip non è stata finora sfruttata nella sua piena potenzialità proprio per la difficoltà di attuare un'analisi in tempo reale delle relative immagini di fluorescenza. Inoltre, poiché i protocolli diagnostici esigono in
35 generale un certo numero di esperimenti su microarray,

il tempo necessario per l'analisi delle immagini risultanti (tempi di analisi dell'ordine di 10-30 minuti) grava in modo abnorme sull'efficienza di tale metodo.

5 Scopi e sintesi dell'invenzione

Esiste dunque la necessità di realizzare un sistema alternativo in grado di elaborare in tempo reale immagini quali le immagini generate da un microarray del tipo descritto.

10 Lo scopo della presente invenzione è quello di realizzare un sistema che consenta di realizzare in modo efficiente e rapido l'analisi automatica di immagini quali le immagini provenienti da DNA chip, dopo ibridazione, al fine di identificare le eventuali
15 affinità del campione analizzato ai frammenti di DNA presenti sul DNA chip.

Secondo la presente invenzione, tale scopo viene raggiunto grazie ad un sistema avente le caratteristiche richiamate in modo specifico nelle
20 rivendicazioni che seguono.

In sintesi, nella forma di attuazione al momento preferita, la presente invenzione prevede di realizzare un sistema che consente di analizzare automaticamente le immagini provenienti da DNA chip, dopo ibridazione.
25 Ciò avviene acquisendo le immagini mediante sensori ottici a matrice ed eseguendo, tramite una rete neurale cellulare (Cellular Neural Network o, brevemente, CNN), un'elaborazione delle immagini acquisite. Tale elaborazione è essenzialmente di tipo analogico e si
30 realizza in modo distribuito spazialmente su tutto lo sviluppo della matrice del microarray.

Per una generale illustrazione delle caratteristiche di una rete neurale cellulare si può far utilmente riferimento al documento US-A-5 140 670.

Nella forma di attuazione dell'invenzione al momento preferita, l'analisi delle immagini viene effettuata attraverso un processo di calcolo che tiene conto delle leggi fisico-chimiche poste alla base delle
5 reazioni che intervengono sul microarray.

In modo particolarmente vantaggioso, la suddetta architettura a rete neurale cellulare comprende una matrice di celle localmente interconnesse attraverso connessioni sinaptiche e tale matrice presenta una
10 distribuzione spaziale sostanzialmente correlata alla forma matriciale delle immagini elaborate.

Un sistema secondo l'invenzione può essere facilmente realizzato in una configurazione system-on-a-chip, in cui tutto il sistema di acquisizione ed
15 elaborazione delle immagini è integrato su un solo chip, ad esempio con tecnologie VLSI CMOS. In proposito si può fare riferimento al lavoro di Rodriguez-Vasquez A. et al., "Review of CMOS Implementations of the CNN Universal Machine-Type Visual Microprocessors"
20 pubblicato nei Proceedings of ISCAS 2000 (IEEE Int. Symposium on Circuits And Systems), Geneva, May 28-31, 2000.

Più in particolare, la presente invenzione riguarda un sistema monoliticamente integrato su
25 semiconduttore per l'analisi automatica di immagini quali le immagini provenienti da microarray del tipo comprendente sensori ottici a matrice per l'acquisizione delle immagini e un'architettura di elaborazione analogica parallela ad elevata efficienza
30 computazionale, basata sull'uso di una rete neurale cellulare. Inoltre l'invenzione consente di integrare su singolo chip tutto il sistema di acquisizione ed elaborazione delle immagini.

Le caratteristiche e i vantaggi del sistema
35 secondo l'invenzione risulteranno dalla descrizione,

fatta qui di seguito, di un suo esempio di realizzazione dato a titolo indicativo e non limitativo.

Breve descrizione dei disegni

5 Nei disegni allegati alla presente descrizione:

- la figura 1 è uno schema di base della realizzazione del sistema per l'analisi automatica delle immagini provenienti da DNA chip, dopo ibridazione;

10 - le figure 2 a 5 illustrano, tanto sotto forma di schemi a blocchi, quanto con il ricorso a diagrammi, i criteri posti alla base dell'organizzazione e del funzionamento una rete neurale cellulare;

- la figura 6 mostra un esempio di immagine
15 proveniente da DNA chip dopo ibridazione e la relativa scomposizione in tre componenti cromatiche;

- la figura 7 è un diagramma di flusso che schematizza il procedimento attraverso il quale a ciascuna componente cromatica di un'immagine letta da
20 un DNA chip viene applicata una sequenza di elaborazione delle immagini con reti neurali cellulari;
e

- la figura 8 (suddivisa in due parti, indicate rispettivamente come 8a ed 8b) e le figure 9 a 12
25 illustrano, a titolo esemplificativo, lo svolgimento di varie operazioni di filtraggio, segmentazione e operazioni morfologiche suscettibili di essere attuate in un sistema secondo l'invenzione al fine di isolare le informazioni utili rispetto alle diverse sorgenti di
30 rumore che potrebbero dar luogo a false interpretazioni dei risultati in sede di analisi automatica dell'immagine da microarray.

Descrizione dettagliata di un esempio preferito di
attuazione dell'invenzione

Così come già indicato in precedenza, la soluzione
5 secondo l'invenzione offre una vantaggiosa alternativa
rispetto ai tradizionali sistemi di analisi delle
immagini di fluorescenza provenienti da DNA chip.

In particolare, la soluzione secondo l'invenzione
utilizza la classe di array (di solito bidimensionali)
10 di processori analogici noti come reti neurali
cellulari (CNN) e viene implementata in un sistema che
è in grado di elaborare in tempo reale tali immagini.

Nella figura 1 il riferimento I indica
un'immagine, ad esempio in forma di matrice quadrata di
15 punti (spot), formata su un DNA chip (di tipo noto e
come tale non illustrato nelle figure).

Tale immagine viene "letta", conservandone
l'organizzazione matriciale, da un sensore ottico,
realizzato ad esempio in tecnologia CMOS ed associato
20 ad un sistema di elaborazione del tipo di quello
rappresentato nella figura 2 ed indicato nel complesso
con il riferimento 20.

Così come meglio illustrato nel seguito, il
sistema 20 è configurabile come sistema di elaborazione
25 a rete neurale cellulare (CNN), ossia come sistema
elaborativo analogico e parallelo, di preferenza
integrato sullo stesso chip che ospita il blocco 10 in
cui è integrato il sensore ottico.

In particolare (si faccia sempre riferimento allo
schema a blocchi della figura 2), oltre alla schiera o
30 array di celle analogiche con sensori ottici
costituente il blocco 10 in cui è integrato il sensore
ottico, il sistema in questione comprende di preferenza
un insieme di memorie analogiche 11 suscettibile di
35 cooperare con il sensore 10 secondo i criteri meglio

descritti nel seguito, nonché una corrispondente circuitazione di ingresso/uscita 12, di tipo complessivamente noto.

Il funzionamento dei componenti 10 e 12 appena descritti si realizza sotto la supervisione di una logica di controllo 13.

Di preferenza, la logica 13 agisce sulla circuitazione 12 in modo diretto. La stessa logica 13 è di solito configurata in modo da agire sull'array 10 tanto in modo diretto quanto attraverso un convertitore analogico/digitale 14 a cui confluiscono selettivamente, attraverso un insieme di registri digitali 15 di configurazione della rete neurale, le istruzioni contenute in una memoria di programma 16.

Si sottolinea peraltro il fatto che, secondo una caratteristica importante dell'invenzione, il sistema 20 è configurato come rete neurale cellulare, il che evita di dover attuare una conversione analogico/digitale e/o viceversa dei valori di ciascun elemento o pixel dell'immagine acquisita all'uscita del sensore ottico 10, consentendo altresì di attuare l'algoritmo di analisi dell'immagine del microarray secondo un criterio di elaborazione totalmente in parallelo.

Le varie operazioni che costituiscono l'algoritmo vengono realizzate mediante un'opportuna impostazione dei parametri che vengono di volta in volta programmati nei registri di configurazione 15 della rete neurale.

In tal modo viene realizzato un vero e proprio algoritmo come sequenza di operazioni elementari attuate sull'immagine a colori, ovvero sulle sue componenti cromatiche, costituite di preferenza dalle sole componenti rossa R e verde G, dunque con esclusione della componente blu B, così come riportato in figura 1.

Le figure 3 a 5 illustrano lo schema di principio che implementa il modello di una rete neurale cellulare come array di celle 100. Tali celle sono identiche tra di loro e tutte solo localmente interconnesse
5 attraverso connessioni sinaptiche pesate.

Il modello circuitale di ciascuna cella 100 è rappresentato nello schema della figura 4, dove sono schematicamente illustrati i valori inclusi nelle matrici A e B e nel coefficiente I di bias. Tali valori
10 consentono di generare, a partire da un segnale di ingresso (Input) un corrispondente valore di uscita (Output) pesato attraverso la funzione $h(x)$ rappresentata nella figura 5.

Tutto ciò corrisponde a criteri di per sé noti e
15 che non richiedono dunque di essere illustrati in maggior dettaglio in questa sede.

Ritornando allo schema a blocchi della figura 2, si apprezzerà che il blocco 10 è essenzialmente costituito da una matrice di celle analogiche al cui
20 ingresso arrivano i segnali di corrispondenti sensori ottici che leggono l'immagine I che si produce nel microarray.

La memoria analogica 11 consente di memorizzare le immagini e gli stati intermedi dell'elaborazione. Le
25 istruzioni e i relativi parametri sono invece memorizzati in forma digitale nella memoria 16 e nei registri 15 e vengono applicati al blocco 10 attraverso il convertitore 14. La logica di controllo 13 provvede a sincronizzare tutte le operazioni di acquisizione ed
30 elaborazione delle immagini, oltre ai segnali di I/O per l'utente finale, che transitano attraverso il blocco 12.

Secondo la concezione di Chua e Yang, le equazioni di modello della rete neurale cellulare sono le
35 seguenti:

$$RCdx_{ij}/dt = -x_{ij} + \sum A(l,m) \cdot y_{lm} + \sum B(l,m) \cdot u_{lm} + I_{bias}$$

dove le sommatorie si estendono a tutti i valori (l,m) appartenenti alle celle dell'intorno N(Cij) adiacenti alla cella Cij in questione e

$$y_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{se } x_{ij} < x_{low} \\ 1 & \text{se } x_{ij} > x_{high} \\ x_{ij} & \text{altrimenti} \end{cases}$$

Una possibile differenziazione di modello, nota con il nome di modello FSR (Full State Range) e legata per lo più ad una semplificazione circuitale in sede di realizzazione circuitale con tecnologie VLSI CMOS, viene nel seguito riportata:

$$\tau dx_{ij}/dt = -g(x_{ij}) + \sum A(l,m) \cdot y_{lm} + \sum B(l,m) \cdot u_{lm} + I_{bias}$$

dove anche qui le sommatorie si estendono a tutti i valori (l,m) appartenenti a N(Cij) e

$$g(x_{ij}) = \begin{cases} x_{low} & \text{se } x_{ij} < x_{low} \\ x_{high} & \text{se } x_{ij} > x_{high} \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases}$$

Ovviamente gli algoritmi da implementare dipendono dal tipo di analisi richiesta dall'esperto. Tuttavia esistono passi importanti, quali la riduzione delle componenti pulizia del rumore o l'eliminazione di spot deformati, che devono essere preferibilmente effettuati in ogni caso.

A titolo di esempio si riporta un algoritmo che estrae, a partire da un'immagine dovuta a due sonde dalle fluorescenze rossa e verde, gli spot relativi a tre differenti livelli per ciascun colore, che indicano tre diversi gradi di affinità tra le sonde ed i geni presenti sulla microgriglia.

La figura 6 mostra un esempio di immagine I proveniente da DNA chip dopo ibridazione. Per la classificazione delle affinità è di solito sufficiente analizzare soltanto le due componenti cromatiche R (rosso) e G (verde). Questo in quanto non esistono

reazioni in grado di generare livelli apprezzabili di componente B (blu), ovvero la terza componente del noto modello colore RGB (Red Green Blue).

5 Ciò implica innanzitutto una possibile semplificazione hardware della parte di acquisizione delle immagini, ovvero del sensore ottico compreso nel blocco 10.

10 Così come già detto, per la lettura delle immagini dei DNA chip si utilizzano sensori ottici (ad esempio CMOS), siano essi in bianco e nero, ovvero sensori di Bayes a quattro sezioni RGGB. L'immagine che si ottiene viene quindi convertita, dopo digitalizzazione, in immagine RGB, YUV, etc. in funzione del tipo di elaborazione o di applicazione di riferimento.

15 Nella soluzione secondo l'invenzione tale forma di pre-elaborazione può essere eliminata risultando anche possibile utilizzare, quali sensori selettivamente sensibili a componenti cromatiche distinte, semplici sensori in bicromia anziché sensori di Bayes.

20 Inoltre, dovendosi implementare un trattamento tipicamente analogico, non si rende necessaria alcuna operazione di digitalizzazione, essendo quindi sufficiente applicare a ciascuna delle due componenti cromatiche trattate (R e G) una sequenza di
25 elaborazione delle immagini con reti neurali cellulari, basata su template, ad esempio secondo il processo schematizzato nel diagramma di flusso riportato in figura 7.

30 Si apprezzerà che la sequenza di operazioni di trattamento ivi illustrate si presta ad essere attuata totalmente in parallelo, quindi in modo simultaneo (con una conseguente riduzione dei tempi totali di trattamento) sulle due componenti cromatiche R e G. Queste ultime sono desunte dall'immagine di partenza I
35 in modo noto, ad esempio tramite filtraggio o

sfruttando la disponibilità di sensori ottici con caratteristiche di selettività cromatica.

In sostanza, la sequenza di trattamento in questione comprende, nella forma di attuazione
5 dell'invenzione al momento preferita:

1. un'operazione di "pulitura del fondo" (clear background), attuata nei passi indicati con 201 e 301,
- 10 2. un'operazione di analisi di griglia (grid analysis), attuata nei passi indicati con 202 e 302,
- 15 3. un'operazione di eliminazione delle macchie (spot) irregolari di dimensioni più piccole, attuata nei passi indicati con 203 e 303,
4. un'operazione di eliminazione delle macchie di dimensioni maggiori, attuata nei passi indicati con 204 e 304,
- 20 5. un'operazione di analisi di intensità, attuata nei passi 205 e 305,
6. un'operazione di sogliatura, ad esempio su tre livelli, attuata nei passi 206 e 306, ed infine
- 25 7. un'operazione di combinazione dei risultati ottenuti in relazione alle due componenti cromatiche analizzate, attuata ad esempio sotto forma di prodotto logico (AND) in un passo finale indicato con 40.

I tre livelli (alto, medio e basso) in funzione
30 dei quali viene svolta l'operazione di sfogliatura rappresentata dai blocchi 206 e 306 sono stati rappresentati rispettivamente come 2061, 2062 e 2063 (componente rossa R) e come 3061, 3062, e 3063 (componente verde G).

Tutte le operazioni di cui sopra, compresa l'operazione finale di AND logico, vengono effettuate all'interno della rete neurale cellulare mediante template, ossia tramite opportuni insiemi di parametri
5 che vengono di volta in volta programmati nei registri di configurazione della rete (indicati con 15 nello schema di figura 2).

Le sequenze di operazioni danno luogo ad una serie di risultati intermedi corrispondenti ad immagini che
10 possono essere memorizzate nella memoria analogica del sistema, indicata con 11 nella figura 2.

Le figure 8 a 12 riportano, a titolo di esempio, i risultati intermedi corrispondenti alle principali operazioni dove sono richieste alcune specifiche
15 operazioni di filtraggio, segmentazione e operazioni morfologiche al fine di isolare le informazioni utili rispetto alle diverse sorgenti di rumore che potrebbero dar luogo a false interpretazioni dei risultati in sede di analisi automatica dell'immagine I ottenuta dal
20 microarray.

Più in particolare, la figura 8, suddivisa in due parti, indicate rispettivamente con 8a ed 8b, si riferisce all'operazione di pulitura del fondo (passi 201 e 301 del diagramma della figura 7).

25 In una prima soluzione, rappresentata nella figura 8a, l'immagine di partenza da elaborare, indicata con 50 e costituita da un insieme di macchie o spot, viene sottoposta a sogliatura rispetto ad un valore fisso (ad esempio una soglia pari 0,85 del valore di intensità massima normalizzata dell'immagine) così da
30 ottenere un'immagine risultante 51.

Nella variante rappresentata nella figura 8b lo stesso risultato viene perseguito attraverso un filtraggio per diffusione, rappresentato in 52 e basato
35 sull'uso di template con cui vengono sfocati i contorni

degli spot. Sull'immagine così ottenuta viene eseguita un'operazione di media, rappresentata in 53, che porta alla formazione dell'immagine risultante, anche qui indicata con 51.

5 Nel caso in cui l'immagine trattata (qui supposta coincidere con l'immagine 51 vista in precedenza, il che non è peraltro imperativo) risulti "sporca", ad esempio, così come mostrato in figura 9, per la presenza di una macchia che non consente di individuare
10 gli spot, viene utilizzato un'ulteriore template o griglia 55 con la funzione di filtrare il rumore ed eliminare gli spot che cadono, in condizioni di sovrapposizione (overlapping) sui contorni della griglia 55 stessa. L'immagine risultante così ottenuta
15 è stata indicata con 56.

Nelle figure 10 e 11 sono mostrate le sequenze di elaborazione realizzate per mezzo di altri due template.

In particolare, in figura 10 è illustrata
20 l'applicazione ad un'immagine di partenza (qui supposta coincidere con l'immagine 56, il che ancora una volta non è imperativo) di un template di erosione suscettibile di operare un'azione di erosione sul fianco destro 57a, sul fianco sinistro 57b, in senso
25 orizzontale 57c ed in senso verticale 57d degli spot della suddetta immagine.

Si realizza così un'analisi della forma degli spot, che serve per eliminare le irregolarità degli spot selezionando soltanto gli spot circolari più
30 grandi.

In figura 11 è invece riportata la sequenza che realizza l'analisi dell'intensità diretta a fornire una classificazione degli spot dell'immagine di partenza (supposta coincidere con l'immagine 58 ottenuta in
35 precedenza, il che ancora una volta non è un dato

imperativo) in base all'intensità. Questo avviene in funzione di tre livelli di soglia (ad esempio pari a -0,5; 0 e +0,5 - i suddetti valori essendo riferiti all'intensità massima normalizzata).

5 Il risultato complessivo ottenibile è la generazione di tre immagini derivanti dalla sogliatura (e dunque di contenuto essenzialmente binario, ossia "scuro" o "chiaro" per ciascun spot), indicate
rispettivamente con 59a, 59b e 59c e suscettibili di
10 essere utilizzate per lo svolgimento dell'operazione di prodotto logico (AND) rappresentata dal blocco 40 della figura 7.

Lo svolgimento di tale operazione è schematicamente rappresentato nella figura 12. Qui i
15 riferimenti 591 e 592 indicano in generale due immagini di sogliatura ottenute rispettivamente per la componente rossa R e per la componente verde G, combinate tramite prodotto logico (AND) per generare un'immagine finale 60, suscettibile di essere messa a
20 disposizione dell'utilizzatore finale sotto forma di una visualizzazione (su schermo e/o di tipo hard copy) pilotata dall'unità 12 della figura 2.

Le tempistiche di calcolo riscontrate per ciascuna delle operazioni sopra descritte evidenziano una
25 capacità computazionale ben più elevata rispetto alle normali tecniche di trattamento delle immagini basate su elaboratori digitali. Ad esempio, utilizzando come unità di misura temporale la costante di tempo del chip t_{CNN} (tipicamente dell'ordine di 250 nanosecondi), si è
30 verificato che ciascuna delle varie operazioni di applicazione di template descritte in precedenza richiede tipicamente da 3 a 6 delle suddette unità di temporali, con valori che scendono ad una sola di tali unità nel caso di semplici operatori logici e tempi

leggermente superiori (ad esempio 10 unità t_{CNN}) nel caso di operazioni di richiamo (recall).

In particolare l'intero algoritmo descritto in precedenza è suscettibile di essere svolto in circa 275
5 microsecondi, ovvero in meno di 1 millisecondo.

I vantaggi principali derivanti dall'utilizzo della soluzione secondo l'invenzione sono molteplici.

Innanzitutto, è possibile effettuare l'analisi del DNA in modo automatico e, conseguentemente, oggettivo.
10 Questo in contrapposizione ad un'analisi soggettiva effettuata da operatori umani con normali strumenti di elaborazione delle immagini digitalizzate.

Il secondo vantaggio è l'elevata velocità di elaborazione, che consente di elaborare immagini, anche
15 di grandi dimensioni, direttamente on-chip con tempi di elaborazione estremamente brevi. Tali tempi dipendono solamente dal valore della costante di tempo RC delle celle della rete neurale cellulare e dal tempo di acquisizione dei sensori ottici, non risultando
20 necessaria alcuna conversione analogico/digitale (e/o viceversa) dei valori di ciascun pixel dell'immagine acquisita all'uscita del sensore ottico rispetto alla matrice di elaborazione operante in parallelo che realizza l'algoritmo di analisi dell'immagine del
25 microarray.

Infine, è possibile riprogrammare il sistema in maniera semplice attraverso pochi coefficienti che definiscono i template della rete neurale cellulare, corrispondenti alle singole operazioni memorizzate
30 nella memoria interna del sistema, in corrispondenza dei valori delle connessioni sinaptiche tra celle adiacenti.

Naturalmente, fermo restando il principio dell'invenzione, i particolari di realizzazione e le
35 forme di attuazione potranno essere ampiamente variati

rispetto a quanto descritto ed illustrato, senza per questo uscire dall'ambito della presente invenzione, così come definito dalle rivendicazioni annesse. Ciò vale in particolare per quanto riguarda la possibilità

5 di applicazione della soluzione secondo l'invenzione al trattamento di immagini di natura qualsiasi. La portata dell'invenzione non è quindi necessariamente limitata al trattamento di immagini di DNA chip.

RIVENDICAZIONI

1. Sistema per l'analisi automatica di immagini (I), quali immagini di microarray di DNA dopo ibridazione, dette immagini (I) comprendendo una matrice di punti o spot, il sistema essendo suscettibile di essere associato ad un sensore (10) per l'acquisizione di dette immagini (I) e comprendendo un circuito (20) per l'elaborazione dei segnali corrispondenti a dette immagini (I) generati da detto sensore (10), caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato secondo un'architettura di trattamento analogico parallelo di detti segnali delle immagini a rete neurale cellulare (CNN).
2. Sistema secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) è configurato per acquisire, quali dette immagini (I), immagini di fluorescenza provenienti da microarray di DNA.
3. Sistema secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detta architettura a rete neurale cellulare comprende una matrice di celle (100) localmente interconnesse attraverso connessioni sinaptiche, detta matrice presentando una distribuzione spaziale sostanzialmente correlata alla forma matriciale di dette immagini (I).
4. Sistema secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) è un sensore ottico a matrice.
5. Sistema secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) è un sensore ottico a colori.
6. Sistema secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1, 4 o 5, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) è un sensore ottico selettivamente

sensibile a componenti cromatiche distinte (R, G, B) di dette immagini (I).

7. Sistema secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato per elaborare segnali corrispondenti solo ad alcune (R, G) di dette componenti cromatiche distinte (R, G, B) di dette immagini (I).

8. Sistema secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato per elaborare segnali associati a componenti cromatiche distinte (R, G) di dette immagini (I) con esclusione della componente cromatica blu (B).

9. Sistema secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 8, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato per elaborare in parallelo i segnali corrispondenti a dette componenti cromatiche distinte (R, G) di dette immagini (I).

10. Sistema secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) e detto circuito di elaborazione (20) sono integrati su un singolo chip.

11. Sistema secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che detto sensore (10) e/o detto circuito di elaborazione (20) sono realizzati con tecnologie VLSI CMOS.

12. Sistema secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato per realizzare su detti segnali corrispondenti a dette immagini (I) almeno una delle operazioni scelte nel gruppo costituito da:

- pulitura del fondo (clear background - 201, 301) di dette immagini (I),
 - analisi di griglia (grid analysis - 202, 302) di dette immagini (I),
 - 5 - eliminazione delle macchie (spot) irregolari di dimensioni più piccole (203, 303),
 - eliminazione delle macchie di dimensioni maggiori (204, 304),
 - analisi di intensità (205, 305), e
 - 10 - sogliatura (206, 306).
13. Sistema secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 9, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) è configurato per realizzare un'operazione di combinazione di risultati di
- 15 elaborazione (591, 592) ottenuti in relazione a componenti cromatiche distinte (R, G) di dette immagini.
14. Sistema secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che detta operazione di
- 20 combinazione è un prodotto logico (AND - 40).
15. Sistema secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) comprende:
- almeno una memoria analogica (11) per la
 - 25 memorizzazione di segnali corrispondenti a dette immagini (I), e
 - una logica di controllo (13) per l'esecuzione delle sequenze di elaborazione dell'immagine in tempo reale.
- 30 16. Sistema secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che le immagini e gli stati intermedi dell'elaborazione vengono memorizzati da detta almeno una memoria analogica (11).
17. Sistema secondo la rivendicazione 15 o la
- 35 rivendicazione 16, caratterizzato dal fatto che detto

circuito di elaborazione (20) comprende mezzi (15) per la memorizzazione dei parametri di configurazione di detta rete neurale cellulare.

18. Sistema secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto che detti parametri di configurazione sono memorizzati in forma digitale e detto circuito di elaborazione (20) comprende un convertitore digitale/analogico (14) per convertire detti parametri in forma analogica in vista
5
10 dell'alimentazione a detta rete neurale cellulare.

19. Sistema secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che detto circuito di elaborazione (20) elabora detti segnali corrispondenti a dette immagini (I) tramite
15 l'applicazione agli stessi di insiemi di parametri (template) della rete neurale cellulare.

RIASSUNTO

Il sistema è utilizzabile per l'analisi automatica di immagini (I) comprendenti una matrice di punti o spot
5 quali le immagini di microarray di DNA dopo ibridazione. Il sistema è suscettibile di essere associato, e di preferenza è integrato in un unico componente monolitico realizzato con tecnologia VLSI CMOS, con un sensore (10) per l'acquisizione delle
10 immagini (I). Il sistema comprende un circuito (20) per l'elaborazione dei segnali corrispondenti alle immagini (I) configurato secondo un'architettura di trattamento analogico parallelo dei segnali a rete neurale cellulare (CNN).
15 (Figura 2)